



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 48/00, C12N 15/86 // 7/01	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/20146 (43) Date de publication internationale: 15 septembre 1994 (15.09.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00220 (22) Date de dépôt international: 28 février 1994 (28.02.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/02438 3 mars 1993 (03.03.93) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BRIAND, Pascale [FR/FR]; 10, rue du Docteur-Roux, F-75015 Paris (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).	(81) Etats désignés: AU, CA, FI, HU, JP, NO, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: RECOMBINANT ADENOVIRUSES AND USE THEREOF IN GENE THERAPY FOR TREATING EYE DISEASES (54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS ET LEUR UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES OCULAIRES (57) Abstract <p>The use of defective recombinant adenoviruses containing an inserted gene for preparing a pharmaceutical useful for treating eye diseases is disclosed.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne l'utilisation d'adénovirus recombinants défectifs contenant un gène inséré pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des pathologies oculaires.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ADENOVIRUS RECOMBINANTS ET LEUR UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE
POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES OCULAIRES

La présente invention concerne de nouveaux virus recombinants, leur
préparation et leur utilisation en thérapie génique, pour le transfert et l'expression de
5 gènes au niveau de l'oeil. Elle concerne également des compositions pharmaceutiques
comprenant lesdits virus recombinants. Plus particulièrement, la présente invention
concerne des virus recombinants défectifs et leur utilisation pour le traitement de
pathologies oculaires.

Le traitement des pathologies oculaires, et notamment des maladies
10 héréditaires constitue un problème non résolu actuellement. Parmi ces pathologies, on
peut citer par exemple les rétinites pigmentaires, qui résultent d'altérations génétiques,
et pour lesquelles aucun traitement n'est actuellement disponible. Par ailleurs, les
pathologies non héréditaires telles que les atteintes post-inflammatoires
(dégénérescence rétinienne, etc) ne disposent pas non plus aujourd'hui de traitement
15 adapté. En particulier, si l'on tente d'agir préventivement, notamment au moyen de
corticoïdes, on ne dispose actuellement d'aucun moyen satisfaisant pour traiter ces
atteintes.

Il est donc important de pouvoir disposer d'outils permettant un traitement
spécifique, efficace et localisé des pathologies oculaires. La présente invention apporte
20 une solution avantageuse à ce problème, en démontrant la possibilité de traiter les
pathologies oculaires par la thérapie génique.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anormalité
(mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique
dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit
25 in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite
dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Dans ce second cas,
différentes techniques existent, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection
impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1
(1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989)
30 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de
liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment,
l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une
alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard,

différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Toutefois, jusqu'à présent, aucun de ces vecteurs n'a été utilisé ni décrit
5 comme utilisable pour le transfert de gènes au niveau de l'oeil. La présente invention constitue la première démonstration qu'il est possible de traiter les pathologies oculaires par la thérapie génique.

Un premier objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un virus recombinant défectif contenant un gène inséré pour la préparation d'une composition
10 pharmaceutique destinée au traitement des pathologies oculaires.

Plus particulièrement, on utilise selon la présente invention des virus recombinants défectifs dérivés de virus capables d'infecter et d'exprimer un gène inséré dans les cellules de l'oeil, sans entraîner des phénomènes cytopathologiques ou d'effets pathogènes. Des virus susceptibles d'être utilisés dans l'invention sont par exemple les
15 adénovirus, les virus adéno-associés ou encore le virus HSV.

La présente invention repose plus particulièrement sur la mise en évidence que les virus de type adénovirus sont capables de transférer et d'exprimer des gènes désirés au niveau de l'oeil. Les exemples présentés plus loin montrent que les adénovirus sont capables, selon le mode d'administration, de transférer efficacement,
20 pour une durée importante et sans effet cytopathologique, des gènes dans l'endothélium cornéen, dans les cellules photoréceptrices, dans les cellules du nerf optique, dans les cellules bipolaires, etc. Par ailleurs, compte tenu de l'accès relativement aisé aux différents compartiments de l'oeil par la microchirurgie (microinjection), ainsi que de l'existence de barrières naturelles dans cet organe
25 (membrane de Descemet, membrane de Bruch, cristallin, etc) la présente invention permet avantageusement d'effectuer un transfert de gènes très ciblé, en fonction de la pathologie à traiter. Les résultats présentés montrent également que l'expression d'un gène désiré est stable sur une longue période (aucune perte d'activité à 50 jours).

Dans un mode de réalisation préféré, l'invention réside dans l'utilisation d'un
30 adénovirus recombinant défectif contenant un gène inséré pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des pathologies oculaires.

Le terme "virus ou adénovirus défectif" désigne un virus incapable de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus

défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par le gène inséré. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

S'agissant plus particulièrement des adénovirus, il en existe différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Néanmoins, ces virus ne sont pas pathogènes pour l'homme, et notamment les sujets non immuno-déprimés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5). Dans le cas des adénovirus Ad 5, les séquences nécessaires à la réplication sont les régions E1A et E1B.

Des virus recombinants défectifs dérivés de rétrovirus, de virus adéno-associés ou du virus HSV (herpes simplex virus) ont déjà été décrits dans la littérature [Roemer et Friedmann, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211 ; Dobson et al., Neuron 5 (1990) 353 ; Chiocca et al., New Biol. 2 (1990) 739 ; Miyanochara et al., New Biol. 4 (1992) 238; WO91/18088].

Au sens de la présente invention, le terme "gène inséré" désigne toute séquence d'ADN introduite dans le virus recombinant, dont l'expression dans la cellule cible est recherchée.

Il peut s'agir en particulier d'un (ou plusieurs) gène(s) de structure codant pour une (des) protéine(s) ou pour une partie d'une (de) protéine(s). La protéine ou partie de protéine ainsi codée peut être une protéine homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire une protéine qui est normalement exprimée dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie), ou une protéine hétérologue vis-à-vis de ladite cellule. Dans le premier cas, l'expression de la protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Dans le second cas, la protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule lui permettant de lutter contre une pathologie.

Parmi les gènes insérés au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement :

- les gènes impliqués dans des pathologies génétiques oculaires,

- les gènes codant pour des facteurs de croissance, des cytokines ou des neurotrophines : Le rôle protecteur ou curatif du produit d'expression de ces gènes dans différentes pathologies oculaires a été démontré, et notamment sur la détérioration des cellules photoréceptrices sous l'effet de la lumière (Lavail et al., PNAS 89 (1992) 11249).

- les gènes de facteurs de régulation (facteurs de transcription, facteurs de traduction),
- les gènes codant pour des enzymes,
- les gènes codant pour des protéines ayant des propriétés anticancéreuses, telles que les interférons, les facteurs de nécrose des tumeurs, etc, ou encore,
- les gènes codant pour des antigènes permettant une vaccination (une protection) locale contre une infection de l'oeil.

A titre d'exemples spécifiques, mais non limitatifs, on peut citer :

- . le gène de l'ornithine aminotransférase impliqué dans l'atrophie gyree (Akaki et al., J. Biol. Chem. 267(18) (1992) 12950),
- . le gène de la rhodopsine, impliqué dans une forme de rétinite pigmentaire (Dryja et al., Nature 343 (1990) 364),
- . le gène de la périphérine RDS, impliqué dans une forme de rétinite pigmentaire (Farrar et al., Nature 354 (1991) 478),
- . le gène de la tyrosinase, impliqué dans l'albinisme oculocutanée type B1 (Giebel et al., Am. J. Hum. Genet. 48 (1991) 1159),
- . le gène mitochondrial NDI, impliqué dans la maladie de Leber (Howell et al., Am. J. Hum. Genet. 48 (1991) 935),
- . le gène de la sous-unité β de la cGMP phosphodiesterase, qui permet de ralentir la dégénérescence rétinienne (Lem et al., PNAS 89 (1992) 4422),
- . le gène de la rab géranylgeranyl transférase, dont la déficience semble liée à une dégénérescence rétinienne lors de choroïdermies (Seabra et al., Science 259 (1993) 377),
- . le gène du facteur de croissance des fibroblastes basique (bFGF), capable de retarder la dégénérescence des cellules photoréceptrices observée dans certaines dystrophies rétinienne héréditaires (Faktorovich et al., Nature 347 (1990) 83),
- . le gène de l'interleukine-8, qui permet d'induire une néovascularisation dans la cornée (Strieter et al., Am. J. Pathol. 141(6) (1992) 1279).

Le terme "gène inséré" désigne également des séquences antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine.

Généralement, le gène inséré comprend également des séquences permettant son expression dans la cellule infectée. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression dudit gène lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences issues du génome de la cellule que l'on désire infecter, ou du génome du virus utilisé. S'agissant d'adénovirus, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Par ailleurs, lorsque le gène inséré ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus défectif en aval d'une telle séquence.

Dans ce qui suit sont décrites plus en détail la construction et l'utilisation d'adénovirus recombinants défectifs. Il est entendu néanmoins que cette description peut être appliquée par l'homme du métier aux autres virus susceptibles d'être utilisés dans le cadre de la présente invention, ainsi qu'indiqués plus haut.

Les adénovirus recombinants défectifs peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre le gène que l'on désire insérer. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %).

Ensuite, les vecteurs qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant une quantité suffisante de virus recombinant défectif tel que décrit
5 précédemment, sous une forme adaptée à un usage oculaire.

En particulier, le virus recombinant défectif peut être sous forme de solution injectable, de collyre, de pommade ophtalmique, etc. Les véhicules pharmaceutiquement acceptables pour de telles formulations adaptées à un usage oculaire sont notamment des solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de
10 sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), la vaseline, l'huile de vaseline, etc.

Dans le cas de collyres ou de pommades ophtalmiques, il est entendu que les applications thérapeutiques peuvent être plus limitées en raison d'une diffusion plus faible du virus recombinant défectif.

15 Dans leur utilisation pour le traitement des pathologies oculaires, les virus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être administrés selon différents modes, et notamment par injection sous-rétinale, éventuellement précédée d'une vitrectomie, ou par injection intravitreuse, simples ou multiples (voir figure 1). L'injection sous-rétinale peut être réalisée sélectivement dans différents compartiments
20 de l'oeil, et notamment, l'injection peut être réalisée au niveau du vitré, de la chambre antérieure ou de l'espace rétrobulbaire. Les résultats présentés dans la présente demande montrent que ces différents modes d'injection permettent d'infecter de manière ciblée les différents tissus de l'oeil, et notamment, l'endothélium cornéen, les cellules photoréceptrices, les cellules bipolaires, les cellules ganglionnaires ou encore les
25 cellules des muscles oculomoteurs.

Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont
30 formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages

de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Compte tenu de la stabilité d'expression du gène inséré dans la cellule cible, la présente invention devrait permettre de traiter la majorité des pathologies oculaires avec peu d'injections.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement des pathologies oculaires, et notamment celles dont les mécanismes ont été élucidés au niveau moléculaire. En particulier, l'implication de gènes a été démontrée dans l'atrophie gyrée, dans la maladie de Norrie (Hum. Mol. Genet. 1(7) (1992) 461), dans la dégénérescence rétinienne (Bowes et al., PNAS 86 (1989) 9722), dans la maladie de Leber, dans les choroïdemies (Cremers et al., Nature 347 (1990) 674), dans la dégénérescence des cellules photoréceptrices, dans les rétinites pigmentaires, dans l'albinisme, dans le syndrome Kearns-Sayre (Shoffner et al., PNAS 86 (1989) 7952), etc. La présente invention est également pour le traitement des altérations de la cornée acquises résultant de maladies inflammatoires, des atteintes rétinienne post-inflammatoires, etc.

La présente invention rend également possible la thérapie par les protéines ou peptides, dont l'utilisation par les voies classiques d'administration est très hypothétique en raison de leur forte sensibilité aux mécanismes de dégradation et d'élimination de l'organisme, et des problèmes liés à la pénétration dans les cellules. L'emploi de virus selon l'invention permet d'exprimer directement à l'intérieur de la population de cellules ciblées le polypeptide ou la protéine désirée, qui n'est donc plus accessible aux mécanismes mentionnés ci-avant.

L'ensemble des résultats présentés dans la présente demande démontre plus particulièrement que les adénovirus recombinants, défectifs pour la réplication, constituent des vecteurs particulièrement intéressants pour le transfert de gènes in vivo dans les cellules oculaires. Les expériences réalisées montrent la possibilité d'une expression stable à long-terme de gènes dans ces cellules. En particulier, une expression stable est observée 50 jours après l'injection. De plus, le spectre d'expression large dans les différentes cellules oculaires constitue également un résultat particulièrement intéressant dans la mesure où pratiquement toutes les maladies de la rétine (notamment la retinitis pigmentosa) affectent une grande surface de la rétine.

En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

La présente invention est plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'oeil. C = cornée; AC = Chambre antérieure; L = cristallin; V = vitré; I = iris; ON = nerf optique; R = espace rétrobulbaire.

Construction d'un adénovirus recombinant défectif (Ad.RSV β Gal) :

La procédure générale permettant la préparation des adénovirus recombinants a été décrite dans la partie générale de la description.

L'adénovirus Ad.RSV β Gal est un adénovirus recombinant défectif (délété des régions E1 et E3) obtenu par recombinaison homologue in vivo entre l'adénovirus mutant Ad-d1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le plasmide pAd.RSV β Gal (Akli et al. 1993).

Le plasmide pAd.RSV β Gal contient, dans l'orientation 5'→3',

- le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant : la séquence ITR, l'origine de répllication, les signaux d'encapsidation et l'amplificateur E1A;

- le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous),

- un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue entre le plasmide pAd.RSV β Gal et l'adénovirus d1324.

Après linéarisation par l'enzyme ClaI, le plasmide pAd.RSV β Gal et l'adénovirus d1324 sont co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad.RSV β Gal est conservé à -80°C dans 20 % de glycérol. Avant injection, la suspension d'adénovirus est diluée au tiers dans un tampon phosphate PBS.

Injection in vivo

- Protocole

Des souris C57Bl/6 de 3 à 7 semaines ont été anesthésiées avec de l'avertine. Dans chaque oeil a ensuite été injecté 10^7 à 10^8 pfu d'adénovirus recombinant Ad.RSV β Gal, soit au niveau de la chambre antérieure, soit au niveau du vitré, soit au niveau de l'espace rétrobulbaire (voir figure 1). Les animaux ont été sacrifiés 7 à 50 jours après l'injection par dislocation cervicale et les yeux ont été récupérés et fixés dans l'azote liquide. Des sections sagitales et coronales (10-15 μ m) sont réalisées sur cryostat, puis colorées en présence de X-gal pour révéler l'activité β -galactosidase qui peut être visualisée par l'apparition d'une coloration bleue dans le noyau des cellules infectées, et contre-colorées avec de l'hémotoxyline et de l'éosine.

- Injection au niveau de la chambre antérieure

Après injection de 10^8 pfu d'adénovirus Ad.RSV β Gal au niveau de l'espace de la chambre antérieure, seules les cellules de la couche endothéliale expriment l'activité β -galactosidase. En revanche, les cellules épithéliales ou du stroma ne présentent aucune coloration à la suite d'une telle injection. De plus, les cellules marquées (infectées) sont distribuées régulièrement dans la couche endothéliale, quel que soit le temps d'administration. Ce résultat montre que la présente invention permet de transférer et d'exprimer un gène dans les cellules endothéliales de l'oeil.

- Injections intravitréuses

Des injections intravitréuses ont également été réalisées, dans le but d'infecter différents types de cellules de la rétine. Contrairement à la distribution uniforme dans les cellules endothéliales après injection au niveau de l'espace chambre antérieure, la distribution des cellules positives (infectées) après injection intravitréuse est limitée à l'hémirétine correspondant au point d'injection. La taille importante du cristallin et les caractéristiques de viscosité de l'humeur vitrée pourraient expliquer cette expression

confinée. Cependant, lorsque des injections temporales et nasales sont effectuées simultanément, les cellules des 2 hémirétines sont infectées. Ces résultats montrent donc qu'il est possible de transférer et d'exprimer un gène au niveau de la rétine. Ils montrent également que, selon la pathologie à traiter, et notamment selon sa
 5 distribution sur la rétine, il est possible de cibler le transfert sur une hémirétine seulement.

Trois couches nucléaires, correspondant aux cellules ganglionnaires, bipolaires et photoréceptrices présentent également une coloration intense à trois semaines (age à partir duquel le développement de la rétine est terminé), ainsi que chez les souris
 10 adulte. Malgré la présence du signal permettant la localisation nucléaire de la protéine LacZ, le marquage (et donc l'infection) de certaines cellules au niveau du site d'injection est si intense que la coloration diffuse dans le cytoplasme. Pour cette raison, le couche de fibre nerveuse correspondant aux axones des noyaux marqués (qui convergent pour former le nerf optique) est marquée de manière homogène.

15 Une analyse fine des différentes couches de cellules rétinienne ne fait apparaître aucune diminution significative de leur épaisseur. De plus, la tête du nerf optique n'est pas altérée, même à des doses élevées d'adénovirus (10^7 pfu).

- Injection au niveau de l'espace rétrobulbaire

Pour évaluer la possibilité d'une diffusion du virus à travers la sclera, des
 — 20 souris ont été injectées au niveau de l'espace rétrobulbaire. Contrairement à la coloration rétinienne, environ 100 % des fibres des 4 muscles oculomoteurs ont été infectées et expriment l'activité β -galactosidase.

L'ensemble de ces résultats démontre clairement que les adénovirus recombinants, défectifs pour la répllication, constituent des vecteurs particulièrement
 25 intéressants pour le transfert de gènes in vivo dans les cellules oculaires.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un adénovirus recombinant défectif contenant un gène inséré pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des pathologies oculaires.
- 5 2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'adénovirus recombinant défectif est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule infectée.
3. Utilisation selon les revendications 1 ou 2 caractérisée en ce que l'adénovirus recombinant défectif est un adénovirus de type Ad 2.
- 10 4. Utilisation selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que l'adénovirus recombinant défectif est un adénovirus de type Ad 5.
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que le gène inséré comprend des séquences permettant son expression dans la cellule infectée.
- 15 6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que le gène inséré code pour une protéine ou un fragment de protéine.
7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que le gène inséré est une séquence antisens.
8. Utilisation selon la revendication 1 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des pathologies héréditaires telles que les rétinites pigmentaires.
- 20 9. Composition pharmaceutique comprenant une quantité suffisante d'adénovirus recombinant défectif selon la revendication 1, sous une forme adaptée à un usage oculaire.
- 25 10. Composition pharmaceutique selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité suffisante d'adénovirus recombinant défectif dans une forme injectable adaptée à un usage oculaire.

11. Composition pharmaceutique selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité suffisante d'adénovirus recombinant défectif sous une forme de collyre ou de pommade ophtalmique adaptés à un usage oculaire.

12. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 9 à 11 caractérisée en ce que l'adénovirus recombinant défectif est un adénovirus recombinant défectif de type Ad2 ou Ad5.

13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml d'adénovirus recombinant défectif.

1/1

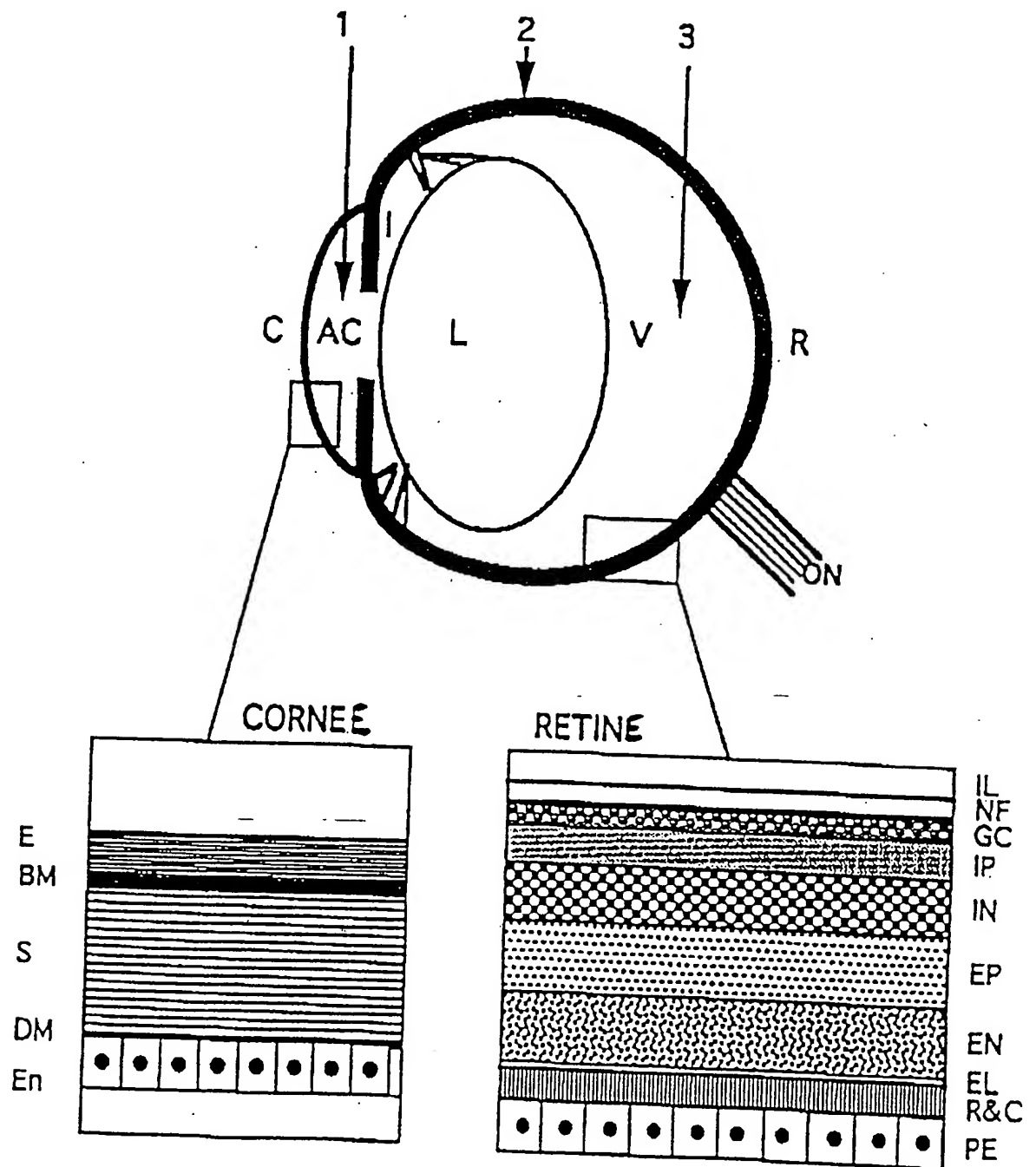


FIGURE 1

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 A61K48/00 C12N15/86 //C12N7/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,90 02551 (BIOSOURCE GENETICS CORPORATION) 22 March 1990 see page 13, paragraph 1-2 see page 19 see page 36, paragraph 2-3; claims 19,20 ---	1-13
Y	THE NEW BIOLOGIST vol. 3, no. 3, March 1991 pages 203 - 218 X. BREAKFIELD AND N. DELUCA 'Herpes simpTex virus for gene delivery to neurons' see the whole document --- -/--	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 June 1994

Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EXPERIMENTAL EYE RESEARCH vol. 50, no. 5 , May 1990 pages 521 - 532 L. STRAMM ET AL 'beta-Glucuronidase mediated pathway essential for retinal pigment epithelial degradation of glycosaminoglucans' see the whole document ---	1-13
Y	SCIENCE. vol. 259 , 12 February 1993 , LANCASTER, PA US pages 988 - 990 G. LE GAL LA SALLE ET AL 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' see the whole document ---	1-13
Y	BONE MARROW TRANSPLANTATION vol. 9, no. SUP1 , 1992 pages 151 - 152 L. STRATFORD-PERRICAUDET ET AL 'Feasibility of adenovirus-mediated gene transfer in vivo' see the whole document ---	1-13
Y	HUMAN GENE TRANSFER vol. 219 , 1991 pages 51 - 61 L. STRATFORD-PERRICAUDET AND M. PERRICAUDET 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' see the whole document ---	1-13
Y	WO,A,92 17211 (EDISON ANIMAL BIOTECHNOLOGY CENTER) 15 October 1992 see abstract; claims ---	7
P,Y	INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE vol. 34, no. 3 , 9 March 1993 pages 473 - 476 D. BOK 'Retinal transplantation and gene therapy' see the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No

PCT/FR 94/00220

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9002551	22-03-90	AU-B- 633517	04-02-93
		AU-A- 4327089	02-04-90
		EP-A- 0434750	03-07-91
		JP-T- 4500672	06-02-92
		US-A- 5210076	11-05-93

WO-A-9217211	15-10-92	AU-A- 1778092	02-11-92
		CA-A- 2107789	06-10-92
		EP-A- 0578776	19-01-94

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 A61K48/00 C12N15/86 //C12N7/01

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 5 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,90 02551 (BIOSOURCE GENETICS CORPORATION) 22 Mars 1990 voir page 13, alinéa 1-2 voir page 19 voir page 36, alinéa 2-3; revendications 19,20	1-13
Y	THE NEW BIOLOGIST vol. 3, no. 3, Mars 1991 pages 203 - 218 X. BREAKFIELD AND N. DELUCA 'Herpes simplex virus for gene delivery to neurons' voir le document en entier	1-13

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

'&' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 Juin 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15-06-1994

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van der Schaal, C

Y	<p>EXPERIMENTAL EYE RESEARCH vol. 50, no. 5 , Mai 1990 pages 521 - 532 L. STRAMM ET AL 'beta-Glucuronidase mediated pathway essential for retinal pigment epithelial degradation of glycosaminoglucans' voir le document en entier ----</p>	1-13
Y	<p>SCIENCE. vol. 259 , 12 Février 1993 , LANCASTER, PA US pages 988 - 990 G. LE GAL LA SALLE ET AL 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' voir le document en entier ----</p>	1-13
Y	<p>BONE MARROW TRANSPLANTATION vol. 9, no. SUP1 , 1992 pages 151 - 152 L. STRATFORD-PERRICAUDET ET AL 'Feasibility of adenovirus-mediated gene transfer in vivo' voir le document en entier ----</p>	1-13
Y	<p>HUMAN GENE TRANSFER vol. 219 , 1991 pages 51 - 61 L. STRATFORD-PERRICAUDET AND M. PERRICAUDET 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' voir le document en entier ----</p>	1-13
Y	<p>WO,A,92 17211 (EDISON ANIMAL BIOTECHNOLOGY CENTER) 15 Octobre 1992 voir abrégé; revendications ----</p>	7
P,Y	<p>INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE vol. 34, no. 3 , 9 Mars 1993 pages 473 - 476 D. BOK 'Retinal transplantation and gene therapy' voir le document en entier -----</p>	1-13

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9002551	22-03-90	AU-B- 633517	04-02-93
		AU-A- 4327089	02-04-90
		EP-A- 0434750	03-07-91
		JP-T- 4500672	06-02-92
		US-A- 5210076	11-05-93
WO-A-9217211	15-10-92	AU-A- 1778092	02-11-92
		CA-A- 2107789	06-10-92
		EP-A- 0578776	19-01-94